

Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de catecolaminas em órgãos reprodutores de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica

D.A.F. Silva¹, M.L. Menezes¹, W.G. Kempinas²

¹Departamento de Química, Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Av. Edmundo Carrijo Coube n° 14-01, CEP 17033-360, Bauru, São Paulo, Brasil.

*²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Distrito de Rubião Jr., s/n°18618-000 Botucatu – São Paulo, Brasil.
dani_fossato@yahoo.com.br*

Resumo: O objetivo deste trabalho foi propor um método rápido e sensível para a determinação simultânea de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) em amostras de órgãos reprodutores de ratos machos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica. O método envolveu a injeção direta do extrato ácido da amostra de tecido em uma coluna cromatográfica com superfície interna de fase (HSA-C₁₈), empregando a fase móvel foi composta por solução de ácido metanosulfônico a 0,013mol L⁻¹ (pH = 3,0): acetonitrila (96:4v/v), 0,033g ácido heptanosulfônico e 0,01g EDTA. A detecção dos analitos foi obtida, através de um detector eletroquímico L-ECD-6A-Shimadzu com potencial em 85mV. A extração das catecolaminas foi utilizado ácido perclórico a 0,4 mol L⁻¹. A extração do analito resultou em valores de recuperação entre 56% e 114%, e coeficiente de variação entre 3,8% a 23%. O limite de quantificação do método ficou entre 0,008 e 0,030 ng mg⁻¹ para a noradrenalina, e 0,009 e 0,051 ng mg⁻¹ para a adrenalina. Em conclusão, o método analítico foi validado e aplicado com desempenho às amostras reais de tecidos biológicos de ratos, permitindo a determinação de baixas concentrações das catecolaminas estudadas. O método apresentou várias vantagens: rapidez, alta precisão, boa seletividade e, ainda, não requer o pré-tratamento da amostra.

Palavras-chave: catecolaminas; órgãos reprodutores; coluna ISRP-C₁₈; CLAE.

Introdução

Catecolaminas

As catecolaminas são aminas ativas que apresentam em sua estrutura química o anel catecol. São substâncias representadas pela noradrenalina, adrenalina, L-dopa e dopamina. Atuam como neurotransmissores e hormônios circulantes no controle do sistema nervoso central e autônomo [1, 2].

Órgãos reprodutores masculinos

O epidídimo consiste em um longo ducto enovelado. É dividido em cabeça, corpo e cauda. Os dois primeiros segmentos estão relacionados com a maturação espermiática, enquanto o segmento terminal destina-se ao armazenamento de esperma. O ducto deferente é a continuação do ducto epididimário, terminando na uretra prostática, onde esvazia seu conteúdo. Antes de entrar na próstata, o ducto deferente se dilata for-

mando uma região chamada ampola. Na porção final da ampola desembocam as vesículas seminais, [3].

Considerações sobre análise de catecolaminas

O emprego da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica é muito utilizado para a determinação de catecolaminas em amostras biológicas. Em plasma ou urina, deve-se realizar a extração e purificação destes compostos antes da determinação pelo CLAE-ECD. Vários métodos de extração e purificação desses neurotransmissores em amostras de tecido ou fluido biológico são empregados. A alumina na forma ácida é o mais utilizado, onde pequenas porções são adicionadas a um determinado volume da amostra, seguido por agitação, centrifugação e filtração. As catecolaminas adsorvidas na alumina são eluídas com auxílio de ácidos diluídos [4, 5, 6]. Pelo método de NI et al. (1989) [7], a extração de catecolaminas foi efetuada empregando a técnica “*on column*”, utilizando difenilboratos seguido pela eluição dos complexos catecolamínicos em coluna cromatográfica C₁₈. Na extração de catecolaminas de tecido de cérebro de rato [8] empregou-se tampão fosfato com pH ajustado em 5,0 seguido por centrifugação a 4°C e filtração. As concentrações de dopamina e noradrenalina foram determinadas em coração de “*Snail Helix Lucorum L*” após a homogeneização das amostras de tecido em solução tampão com pH ajustado em 3,3 contendo padrão interno, para em seguida serem centrifugadas [9]. As concentrações de noradrenalina e metabólitos foram extraídas de ducto deferente de ratos a partir da purificação dos extratos, utilizando colunas de alumina e colunas de borato [10]. As catecolaminas adrenalina, noradrenalina, L-dopa e dopamina foram determinadas em plasma e glândula adrenal de ratos [11] por injeção direta e coluna cromatográfica ISRP-C₁₈ imobilizada com a proteína albumina (HSA) do soro humano [11].

Outras técnicas analíticas como LC/MS e eletroforese capilar foram também descritas para a determinação de catecolaminas em amostras biológicas [12].

O objetivo deste trabalho foi propor e validar um método rápido e sensível para a determinação simultânea de noradrenalina e adrenalina

em órgãos reprodutores de ratos machos, utilizando coluna ISRP-C₁₈ e injeção direta da amostra em CLAE-ECD.

Materiais e métodos

Reagentes

A acetoneitrila foi obtida da Carlo Erba (Milan, Italy); os padrões de adrenalina, noradrenalina, sulfato de guanetidina, ácido heptanosulfônico, ácido metanosulfônico, ácido clorídrico e ácido perclórico foram adquiridos da Aldrich-Sigma (Milwaukee - USA). A água deionizada foi fornecida a partir de um sistema de purificação Milli-Q, obtido da Millipore (Millipore, Bedford, MA). As soluções-padrão foram preparadas dissolvendo-se uma massa de 0,001g de cada catecolamina (noradrenalina e adrenalina) em 10 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. A partir desta solução estoque foram realizadas diluições em ácido perclórico 0,01 mol L⁻¹, obtendo-se concentrações de catecolaminas para a construção de curvas analíticas e determinação do limite de detecção.

Animais

Foram utilizados 29 ratos machos da variedade Wistar, com idade inicial de 90 dias, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, e 20 ratos machos da variedade Sprague-Dawley, com idade inicial de 90 dias, provenientes da Universidade de Campinas, UNICAMP. Os animais foram mantidos durante os experimentos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP. Os animais foram aclimatados ao novo ambiente por um período mínimo de uma semana antes dos experimentos.

Instrumentação

A separação das catecolaminas foi realizada em um sistema gradiente de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), equipado com duas bombas recíprocas Modelo LC-10ADVP, uma válvula Switching FCV-12AH; um detector eletroquímico Shimadzu L-ECD-6A, válvula manual de injeção Rheodyne 7125, ligada a uma alça de 1000 µL, (Cotati, CA, USA) e uma

estação de tratamento de dados Work Station-Computador Pentium 233 - Metron; adquirido da Shimadzu, (Shimadzu, Japan).

Condições cromatográficas

Foi empregado uma coluna cromatográfica ISRP - C₁₈, (250 mm x 2,0 mm DI), Luna-Phenomenex com diâmetro de partícula 5µm, adquirida pela Labtron e Comércio Ltda, previamente preparada de acordo com protocolo de MENEZES e FÉLIX [13]. As determinações foram realizadas em temperatura controlada a 25°C, empregando a fase móvel composta por solução aquosa de ácido metanosulfônico 0,013mol L⁻¹, com pH ajustado em 3,0 e acetoni-trila (96:4 v/v), 0,01g de EDTA e 0,033g de ácido heptanosulfônico, com uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹.

Métodos

Otimização do potencial eletroquímico

O estudo do potencial eletroquímico adequado foi avaliado testando-se potenciais entre + 30mV a + 100mV. Para cada potencial eletroquímico foram feitas injeções em triplicata de 1.000 µL de solução padrão contendo 1µg mL⁻¹ de catecolaminas.

Coleta dos órgãos reprodutores

Os animais foram anestesiados com éter etílico e mortos por decapitação, procedendo-se à coleta da cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal. Os órgãos foram pesados, obtendo-se primeiramente o peso “cheio” e depois o “vazio” (sem a secreção) do ducto deferente e vesícula seminal, e posteriormente congelada.

Tratamento das amostras

Extração

Adaptou-se a metodologia de MOURA e colaboradores, onde se utilizou ácido perclórico na concentração de 0,1 mol L⁻¹ em amostras de tecido, para 0,4 mol L⁻¹, obedecendo a relação de 1,0 mL de HClO₄ : 100 mg de tecido [14].As amostras foram filtradas e diluídas (1:40 v/v) em água destilada, antes de cada injeção.

Avaliação do tempo de extração

A cada 30 min foram efetuadas diluições (1:40 v/v) em água destilada, de uma alíquota de

0,1 mL do extrato ácido e 1.000 µL de cada uma das amostras foi injetado em triplicata no sistema de cromatografia líquida.

Fortificação da amostra

As fortificações foram feitas para a cauda do epidídimo e o ducto deferente. Considerando que cada animal possui dois epidídimos e dois ductos deferentes (n = 18), e que estes órgãos possuem uma concentração normal de catecolaminas, o protocolo do estudo de recuperação seguiu as seguintes etapas: os órgãos foram divididos em dois grupos denominados de grupo controle (n = 9) e grupo fortificado (n = 9)., cada grupo foi dividido em três subgrupos (n = 3 cada subgrupo). Foram determinadas as concentrações de noradrenalina e adrenalina dos subgrupos controle, e a partir dos valores obtidos, as amostras de cauda do epidídimo e ducto deferente foram fortificadas. As caudas de epidídimo foram fortificadas com 30, 40 e 50 µL, respectivamente, de solução aquosa contendo 2.000µg L⁻¹ de noradrenalina e adrenalina. Os ductos deferentes foram fortificados com 30, 40 e 50 µL de solução aquosa contendo 2.000 µg L⁻¹ de adrenalina, e 60, 70 e 80 µL de solução aquosa contendo 2.000 µg L⁻¹ de noradrenalina.

Estudo da recuperação

Devido ao efeito de matriz a utilização do método de padrão externo ficou impossibilitada, deste modo, empregou-se o método de calibração de adição padrão. Para cada amostra dos subgrupos (n = 3), controle e fortificado, foram feitas quatro diluições em água destilada (1:40 v/v). A seguir foram adicionados volumes de 1, 2 e 4 µL, respectivamente, de solução padrão (2.000 µg L⁻¹), a partir da segunda diluição, obtendo-se concentrações de 0,5, 1 e 2 µg L⁻¹ de noradrenalina e adrenalina. A primeira diluição de cada subgrupo é denominada de amostra testemunha. Deste modo, foram obtidas as curvas analíticas. A exatidão e a precisão dos resultados foram determinadas efetuando-se os cálculos de noradrenalina e adrenalina recuperadas em tecido, e o respectivo coeficiente de variação.

Amostra real

A quantificação das catecolaminas nas

amostras reais foi determinada pelo método de calibração de adição padrão. As amostras foram extraídas sem a adição do padrão (amostra testemunha) e com adição do padrão, ($n = 3$, concentrações de 0,5, 1 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$). As amostras foram injetadas em triplicata.

Resultados e discussão

A fase móvel mais adequada para a separação das catecolaminas foi composta por um sistema de solventes contendo solução de ácido metanosulfônico 0,013 mol L^{-1} , com pH ajustado em 3,0, acetonitrila (96:4 v/v), 0,033g de ácido heptanosulfônico e 0,01g de EDTA. O emprego do ácido metanosulfônico na concentração 0,013 mol L^{-1} melhorou significativamente a estabilização da linha de base do detector eletroquímico; O ácido heptanosulfônico é necessário para promover a retenção das catecolaminas na fase estacionária ISRP- C_{18} , devido à capacidade de formação de par iônico. Foram testadas diferentes concentrações deste ácido. A literatura descreve alguns trabalhos que utilizaram 1,5 mM [15] e 556 mg L^{-1} [5]. Tendo em vista a necessidade de uma metodologia que apresentasse um baixo limite de detecção e um bom desempenho cromatográfico, optou-se por trabalhar com a concentração de 0,033g de ácido heptanosulfônico em 100 mL de fase móvel. Desta forma, pode-se inferir que este composto contribuiu significativamente para a separação das catecolaminas, bem como para a obtenção de um bom desempenho cromatográfico, como pode ser visto na Figura 1.

Vários métodos cromatográficos, utilizando várias técnicas de detecção foram desenvolvidos para determinação de catecolaminas em amostras biológicas [8,16,17,18]. A literatura relata que o potencial eletroquímico mais utilizado na avaliação de catecolaminas em diferentes tecidos é o de +75mV [19]. Neste trabalho, após ensaios para a otimização do potencial eletroquímico, verificou-se que o mais adequado para a análise das catecolaminas em tecidos de órgãos reprodutores de rato foi o de +85mV, como pode ser observado na Figura 2.

Analizando as equações das retas obtidas (Figura 3), observou-se que o modelo linear para

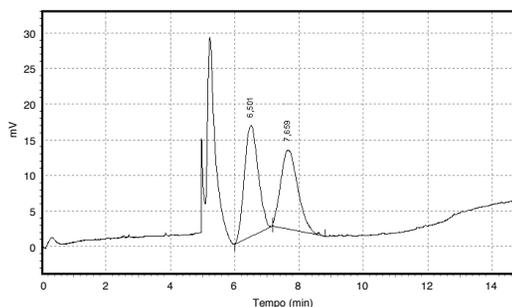


Figura 1. Cromatograma de solução padrão 1,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

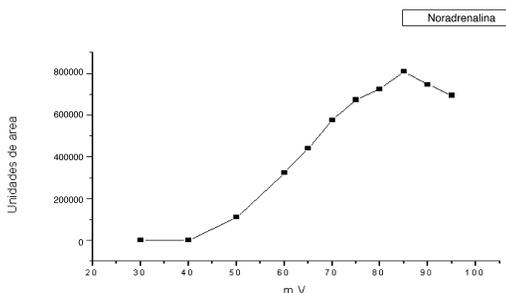


Figura 2. Voltamograma obtido para a noradrenalina e adrenalina após estudo de vários potenciais empregando detector eletroquímico.

a determinação das catecolaminas por CLAE com detector eletroquímico é adequado, já que os coeficientes de correlação foram 0,999 para a noradrenalina e 0,998 para a adrenalina, como pode ser observado na Tabela 1. Estes valores expressam a relação entre e as áreas dos picos cromatográficos nos intervalos utilizados (y) e as concentrações das catecolaminas (x). A relação

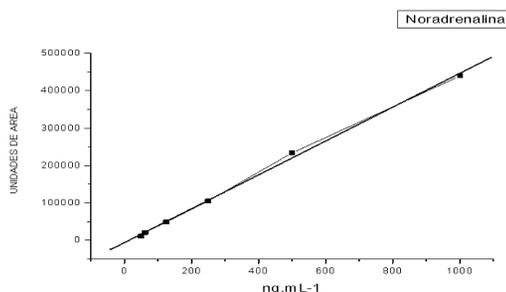


Figura 3. Curvas analíticas para soluções-padrão de noradrenalina e adrenalina

Tabela 1. Parâmetros das curvas analíticas para a noradrenalina e adrenalina.

ANALITO	EQUAÇÃO DE REGRESSÃO LINEAR	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO
Noradrenalina	$y = 6461,99 + 452,52 \cdot x$	0,999
Adrenalina	$y = 2372,12 + 385,33 \cdot x$	0,998

X é expresso em ng mL^{-1} e y é expresso em unidade de área.

de x e y na curva é expressa como r^2 (coeficiente de correlação), onde os valores ideais esperados são 1 e -1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, maior a probabilidade de existir uma relação linear bem definida [20, 21].

O procedimento de extração das catecolaminas foi realizado utilizando o órgão inteiro. É importante enfatizar que a relação de 1,0 mL de ácido perclórico $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ para cada 100 mg de tecido deve ser considerada importante, uma vez que toda a amostra permanece imersa na solução ácida [11]. Fez-se necessária a diluição dos extratos das amostras de cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal em água destilada, na proporção de 1:40 v/v para reduzir a concentração do ácido perclórico para $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ estabilizando o pH da fase móvel em 3,0, possibilitando a retenção das catecolaminas na coluna cromatográfica C_{18} .

Na avaliação do tempo de extração (Tabela 2), observou-se que o melhor rendimento de extração para a noradrenalina foi de 90 min para a análise da cauda do epidídimo e 60 min para a análise do ducto deferente. A extração para a adrenalina nas duas matrizes manteve-se constante a partir de 30 min. Levando-se em consid-

eração que o ducto deferente apresentou concentrações maiores de catecolaminas quando comparado à cauda do epidídimo, era esperado um maior tempo para obter um maior rendimento de extração. Entretanto, isto não ocorreu uma vez que há uma acentuada diferença entre os tecidos desses órgãos.

Para a validação do método foi avaliada a seletividade e a recuperação. Para avaliar a sele-

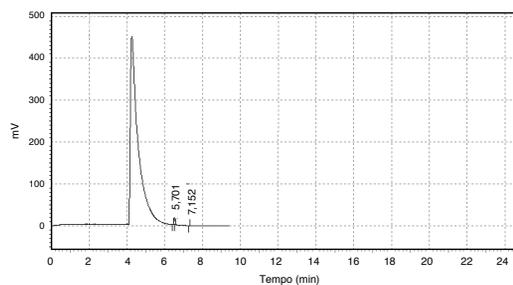


Figura 4. Cromatogramas obtidos após a injeção de $1000 \mu\text{L}$ do extrato ácido da amostra testemunha de cauda de epidídimo (cromatograma A) e após a injeção de $1000 \mu\text{L}$ do extrato ácido da amostra real de ducto deferente de rato Wistar controle, com adição de padrão de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, (cromatograma B).

Tabela 2. Avaliação do tempo de extração da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) em uma amostra de cauda do epidídimo (CE) e uma amostra de ducto deferente (DD) de rato Wistar.

Tempo de extração (CE)	Volume (mL)	NA (ng)	ADR (ng)	Tempo de extração (DD)	Volume (mL)	NA (ng)	ADR (ng)
30 min	1,86	0,78	0,48	30 min	0,70	3,94	5,14
60 min	1,76	1,06	0,37	60 min	0,60	3,86	5,27
90 min	1,66	1,50	0,48	90 min	0,50	3,06	4,01
120 min	1,56	1,35	0,31	120 min	0,40	2,54	3,22
150 min	1,46	1,34	0,39	150 min	0,30	1,91	2,42

tividade do método proposto foram comparados os cromatogramas das amostras testemunhas e das amostras fortificadas. De acordo com os cromatogramas apresentados na Figura 4, nenhum interferente elui no tempo de retenção das substâncias de interesse. O método proposto para este estudo conseguiu atingir valores de LQ para a noradrenalina e adrenalina em amostras de tecidos de órgãos reprodutores de ratos, menores comparados com outros métodos descritos pela

literatura para vários tecidos e/ou amostras biológicas, como pode ser observado na Tabela 3. Com exceção de alguns autores, que quantificaram dopamina, noradrenalina e adrenalina em diferentes tecidos, encontrando valores de LD de 4,20, 0,47 e 1,47 ng mL, respectivamente, analisando córtex cerebral e plasma de rato [19,22]. A maioria dos trabalhos relata o pré-tratamento da amostra, empregando a homogeneização e centrifugação, antes da análise por

Tabela 3. Limite de quantificação para a noradrenalina e adrenalina nas amostras de tecidos de órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley.

ÓRGÃO DO ANIMAL	*(LQ) NA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	*(LQ) ADR ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Wistar		
Cauda do epidídimo	0,027	0,051
Ducto deferente	0,030 *= LQ	0,030 *= LQ
Vesícula seminal	0,014 * < LD	0,050
Sprague-Dawley		
Cauda do epidídimo	0,010 * < LD	0,010 * < LD
Ducto deferente	0,010 * < LD	0,009 * < LD
Vesícula seminal	0,008 * < LD	0,010 * < LD

*LQ: concentração visível que permite a quantificação com precisão e exatidão

* < LD: menor que o limite de detecção

*=LQ: igual ao limite de quantificação

Tabela 4. Avaliação da recuperação da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) na cauda do epidídimo (CE) de ratos Wistar.

Órgão (n = 9)	Concentração fisiológica de NA e ADR (ng mg^{-1})		Concentração fisiológica de NA e ADR fortificada (ng mg^{-1})		Concentração de NA e ADR detectada (ng mg^{-1})		Recuperação (%) (NA) (ADR)		CV (%) (NA) (ADR)	
	CE 1	0,030	0,015	0,840	0,830	0,680	0,830	81	100	
CE 2	0,050	0,034	0,820	0,710	0,920	0,660	112	93	16,50	11,15
CE 3	0,070	0,360	0,820	1,110	0,760	0,830	62	74		
CE 4	0,110	0,040	1,070	1,000	1,020	0,980	95	98		
CE 5	0,050	0,450	1,400	1,800	1,430	1,580	102	56	3,80	10,70
CE 6	0,024	0,018	1,200	1,200	1,120	1,310	101	109		
CE 7	0,310	0,090	0,900	0,680	0,760	0,730	85	107		
CE 8	0,020	0,016	1,150	1,140	0,980	1,100	85	96	4,00	6,40
CE 9	0,030	0,057	1,310	1,340	1,190	1,450	91	108		

N = Número de órgãos.

Tabela 5. Avaliação da recuperação da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) no ducto deferente (DD) de ratos Wistar.

Órgão (n = 9)	Concentração fisiológica de NA e ADR (ng mg ⁻¹)		Concentração fisiológica de NA e ADR fortificada (ng mg ⁻¹)		Concentração de NA e ADR detectada (ng mg ⁻¹)		Recuperação (%) (NA) (ADR)		CV (%) (NA) (ADR)	
	DD 1	0,021	0,010	4,170	2,610	3,680	3,130	88	120	
DD 2	0,060	0,038	3,910	2,450	3,510	2,100	90	86	6,15	19,13
DD 3	0,017	0,059	3,500	2,230	2,800	1,980	80	89		
DD 4	0,110	0,040	3,070	1,520	2,180	1,030	71	68		
DD 5	0,016	0,027	3,020	1,530	2,700	1,230	89	80	23,00	8,10
DD 6	0,110	0,070	3,040	1,590	1,760	1,200	56	75		
DD 7	0,080	0,020	3,410	1,690	3,370	1,940	99	114		
DD 8	0,070	0,010	4,380	2,470	3,500	2,220	80	90	13,50	16,00
DD 9	0,011	0,028	3,340	1,980	2,600	1,680	98	85		

N = Número de órgãos.

CLAE. A metodologia proposta não necessita do pré-tratamento da amostra devido ao emprego da coluna cromatográfica ISRP-C₁₈, a qual permite a injeção direta da amostra [13].

De acordo com o roteiro de validação para amostras biológicas [23,24] os valores de recuperação devem estar entre 70 e 110 %, porém, conforme a complexidade da matriz utilizada e a repetibilidade dos resultados, eles podem apresentar-se entre 60 e 120%, com precisão de $\pm 20\%$. Neste trabalho, os valores de recuperação situaram-se entre 56 e 114 %, com CV entre 3,8 e 23%, como pode ser observado nas Tabelas 4 e 5, para os nos níveis de fortificações de 30, 40 e 50 μL dos padrões para amostras de cauda do epidídimo e 30, 40 e 50 μL de adrenalina e 60, 70 e 80 μL de noradrenalina para amostras do ducto deferente. Assim, os resultados obtidos foram próximos aos encontrados em métodos descritos pela literatura especializada, mostrando-se em concordância com os valores aceitáveis para a validação de nova metodologia em amostras biológicas.

Conclusões

Na determinação da noradrenalina e adrenalina em tecidos de órgãos reprodutores de

ratos, foi observado o efeito de matriz. Deste modo, a avaliação da recuperação das catecolaminas foi ajustada utilizando o método de calibração de adição padrão, o qual foi empregado com sucesso para a avaliação das amostras reais.

Os resultados obtidos através do estudo de recuperação estão de acordo com valores aceitáveis para a validação de uma nova metodologia analítica em amostras biológicas, assegurando a eficiência e a confiabilidade do método.

O método analítico apresentou simplicidade no tratamento das amostras e rapidez de análise, devido ao emprego do ácido perclórico 0,4 mol L⁻¹ no procedimento de extração das catecolaminas presentes em amostras de tecidos e o emprego da coluna cromatográfica ISRP-C₁₈ que permite a injeção direta do extrato ácido da amostra.

Agradecimentos

Os autores agradecem as FAPESP pelo apoio financeiro, para o desenvolvimento deste trabalho.

Recebido em: 30/07/2007

Aceito em: 09/10/2007

D.A.F. Silva, M.L.Menezes, W.G. Kempinas. A new method for simultaneous determination of catecholamines in reproductive organs from rats by high performance liquid chromatography with electrochemical detection.

Abstract: The aim of this research was to propose a new sensitive and fast method to the simultaneous determination of catecholamines (noradrenaline and adrenaline) in samples of reproductive organs from male rats by High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. The method involved direct injection of acid extract on to a serum albumin dimethylcadecyl-silane (HSA-C₁₈) and the utilization of 0.013 mol L⁻¹ methanesulfonic acid (pH = 3.0): acetonitrile (96:4v/v), 0.033g heptanosulfonic acid and 0.01g EDTA as mobile phase. The detection was obtained using an electrochemical detector L-ECD-6A-Shimadzu with a potential of the 85mV. perchloric acid 0.4 mol L⁻¹ was used in the procedure of catecholamine extraction. The extraction of the analyte resulted in recovery values between 56% and 114%, and coefficient of variation between 3.8% and 23%. The quantification limit of the method was between 0.008 and 0.030ng mg⁻¹ for noradrenaline, and 0.009 and 0.051ng mg⁻¹ for adrenaline. In conclusion, the analytical method was validated and applied to the real samples of rats, allowing the determination of low concentrations of the catecholamines studied. The method has various advantages: fast, high precision and good selectivity and do not require sample treatment.

Keywords: catecholamines; reproductive organs; column ISRP- C₁₈; HPLC-ECD.

Referências

- [1] C. R. Benedict, J. Chromatogr. 385 (1987) 369
[2] O. C. M. Pereira; , M. R. Dega; M. S. S. Souza, Gen. Pharmacol. 30 (3) (1998) 417.
[3] C.L. Junqueira; J.Carneiro, Histologia básica, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro,10 ed.,2004, p. 427.
[4] S. Javidan; M.J.Cwik, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol, 19(8) (1996) 1339.
[5] M.G. Naffah-Mazzacoratti; D.E. Casarini; M.J.S. Fernandes; E.E.A. Favalheiro, Arq. B. Endocrinol. Metabol, 36(4) (1992) 119.
[6] R.K. Vetnansky; K.Fukuhara; K.Pacak; G.Cizz; D.S.Goldstein; I.J.Kopin, Endocrinology, 133 (1993) 1411.
[7] P.Ni; F. Guyon; M. Caude; R. Rasset, J. Liq. Chromatogr, 12(10) (1989) 1873.
[8] J.D.Chi; J.Odontiadis; M.Franklin, J. Chromatogr. B, 731(2) (1999) 361.
[9] A.Appa-Louisi; E.Ofalikou; B.Ichaelidis, J. Liq. Chrom. Rel. Techol, 20(15) (1997) 2427.
[10] R.Ishi; S. Mishima; H. Kuriyama, Life Sci, 32 (9) (1983) 933.
[11] A. Sanchez; A.E. Toledo-Pinto; M.L. Menezes; O.C.M. Pereira, Pharmacol. Res, 50(5) (2004) 481.
[12] J.Bergquist; A.Sciubisz; A.Kaczor; J.Silberring, J. Neurosci. Methods, 113(1) (2002) 1.
[13] M.L.Menezes; G.Félix, J. Liq. Chromatogr, 21(18) (1998) 2863.
[14] D.Moura; I.Azevedo; S.Guimarães, Arc. Pharmacol, 342 (2) (1990) 153.
[15] W.G.Kempinas; J.D.Suarez; N.L.Roberts; L.Strader; J.Ferrell; J.M.Goldman; G.R.Klinefelter, Biol. Reprod, 59 (1998) 890.
[16] E.M.Siaghy; Y.Devaux; H.Schroeder; N.Sfaksi; D.Ungureanu-Longrois; F.Zannad; J.P.Villemot; P.Nabet; P.M.Mertes, J. Chromatogr., B, 745(2) (2000) 279.
[17] C.Nup; P.Rosenberg; H.Linke; P.Tordik, J. Endod., 27(2) (2001) 73.
[18] M.A.Gilinsky; A.A. Faibushevish; C.E.Lunte, J. Pharm. Biom. Anal, 24(5-6) (2001) 929.
[19] B.Patel; A.M. Arundell; K.H.Parker; S.M.O.Yeoman; D.Hare, J. Chromatog. B, 818 (2) (2005) 269.
[20] F.Leite, Validação em análise química., Átomo, Campinas, 4 ed., 2002.
[21] R.Causon, J. Chromatogr. B, 689(1) (1997) 175.
[22] E.Sastre; A.Nicolay; B.Bruguerolle; H.Portugal, J. Chromatogr.B, 801 (2004) 205.
[23] P.Chiap; P.H.Hubert; B.Boulanger; J.Crommen, Anal. Chim. Acta, 391 (1999) 227.
[24] M.E.Swartz; I.R.Krull, Pharmacol. Tecnol, 2 (1998) 12.